



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Publication number: **0 552 829 A1**

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: **93200062.3**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07K 13/00, C12Q 1/68,  
G01N 33/53, G01N 33/564,  
G01N 33/68**

(22) Date of filing: **12.01.93**

(30) Priority: **13.01.92 EP 92200065**

(43) Date of publication of application:  
**28.07.93 Bulletin 93/30**

(84) Designated Contracting States:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**

(71) Applicant: **AKZO N.V.**  
**Velperweg 76**  
**NL-6824 BM Arnhem(NL)**

(72) Inventor: **Verheyen, Ronald**  
**Willem Alexanderstraat 6**  
**6611 CE Overasselt(NL)**  
Inventor: **van Venrooy, Waltherus Jacobus**  
**Eleonoraweg 16**  
**6523 MZ Nijmegen(NL)**

(74) Representative: **Hermans, Franciscus G.M. et  
al**  
**P.O. Box 20**  
**NL-5340 BH Oss (NL)**

(54) **CENP-B peptide.**

(57) The invention relates to a peptide or fragment thereof which is immunochemically reactive with anticentromere autoantibodies (ACA).

The invention also relates to a method for the detection of anticentromere autoantibodies or detection of a centromere antigen in a test fluid and also to an immunochemical reagent and a test kit to be used when applying said detection methods.

**EP 0 552 829 A1**

The invention relates to a peptide or fragment thereof which is immunochemically reactive with anticentromere autoantibodies (ACA).

The invention also relates to a method for the detection of anticentromere autoantibodies or detection of a centromere antigen in a test fluid and also to an immunochemical reagent and a test kit for carrying out said detection methods.

Centromere components are one of the targets of a highly selective autoimmune response in certain patients with rheumatic diseases. Although anticentromere autoantibodies (ACA) were observed primarily in limited sclerosis or CREST (Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia) syndrome, they have also been detected in patients with several other rheumatic diseases and vasculitis. Earnshaw et al. showed in 1985 that ACA positive patient sera recognize three immunologically related centromere antigens, CENP-A (17kDa), CENP-B (80kDa), and CENP-C (140kDa). Since antibodies to CENP-B were found to be present at high titers in all ACA positive patient sera, whereas the titers of antibodies to CENP-A and CENP-C were often lower, CENP-B was referred to as the major centromere antigen. It has been shown that ACA and antitopoisomerase I antibodies are helpful clinical markers in systemic sclerosis. Earnshaw et al. succeeded in 1987 in cloning the cDNA of ~95% of the mRNA that encodes CENP-B. They also reported the first use of a protein, i.e. CENP-B, in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to detect autoantibodies in patient sera. The protein used in their experiments encoded 147 amino acid residues from the carboxyl-terminal region of CENP-B fused to 113kba of  $\beta$ -galactosidase. However, for the development of a specific and sensitive method to enable a reliable diagnosis to be made it is of great importance to identify immuno-dominant epitopes on said protein. The last 60 C-terminal amino acid residues of CENP-B surprisingly constitute an important and unexpected autoantigenic domain. The data show that patient sera in which ACA can be detected by immunofluorescence and immunoblotting all contain antibodies against this C-terminal CENP-B fragment. Furthermore, the expression level of this particular part of CENP-B as fusion protein in *E. coli* is much higher than the expression level of the last 157 C-terminal amino acid residues of CENP-B, whereas its antigenicity surprisingly appeared to be at least as high as that of the longer CENP-B fragment. Furthermore this material is very suitable as antigen source in an ELISA system for screening patient sera for anti-CENP-B antibodies.

The invention comprises a peptide with 60 amino acids and an amino acid sequence depicted in the one-letter code as shown in Figure 1 which

is immunochemically reactive with anticentromere autoantibodies (ACA).

The invention also comprises fragments of said peptide which are still immunochemically reactive with ACA and also polypeptides comprising said peptide or said fragment thereof.

Analogues or derivatives of the peptide according to Figure 1 are also included in the invention. The term "analogues" refers for instance to post-expression modifications of a peptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations etc.

The invention also relates to an immunochemical reagent, which reagent comprises at least one of the peptides according to the invention.

The invention also comprises a method for the detection of ACA in a test fluid, in which at least one of the peptides according to the invention is used.

The invention also relates to a method for the detection of a centromere antigen in a test fluid, using at least one of the peptides according to the invention.

The invention also relates to a test kit to be used in an immuno-assay, this test kit containing at least one immunochemical reagent according to the invention.

It is within the scope of this invention to use the new nucleotide sequence coding for the amino acids according to Fig. 1 as the basis of a test to detect CENP-B DNA or RNA by a nucleic acid amplification technique for instance the polymerase chain reaction (PCR) or the nucleic acid sequence based amplification (NASBA).

The peptides mentioned above are found to be particularly suitable for use in a diagnostic method for determining the presence of CENP-B or ACA in a test fluid.

The preparation of the peptides according to the invention is effected by means of one of the known organic chemical methods for peptide synthesis or with the aid of recombinant DNA techniques. This latter method involves the preparation of the desired peptide by means of bringing to expression a recombinant polynucleotide with a polynucleotide sequence which is coding for one or more of the peptides in question in a suitable micro-organism as host.

The organic chemical methods for peptide synthesis are considered to include the coupling of the required amino acids by means of a condensation reaction, either in homogeneous phase or with the aid of a solid phase.

As already indicated above, the peptide according to the invention can likewise be prepared with the aid of recombinant DNA techniques. This possibility is of importance particularly when the peptide is incorporated in a repeating sequence ("in tandem") or when the peptide is prepared as a

constituent of a (much larger) protein or polypeptide. This type of preparation of the peptide therefore likewise falls within the scope of the invention.

A polynucleotide of this type, which is coding for the peptide according to the invention, and a recombinant DNA in which this polynucleotide is incorporated likewise fall within the scope of the invention.

Without specifically being incorporated in the claims, it is self-evident that one or more amino acids in the peptides according to the invention can be replaced by other amino acids or amino acid analogues or derivatives without affecting the immunochemical activity of the peptides in question.

Functional derivatives of the above-mentioned peptides viz.:

- (a) acid addition salts of the peptides;
- (b) amides of the peptides and specifically the C-terminal amides;
- (c) esters and specifically C-terminal esters and
- (d) N-acyl derivatives, specifically N-terminal acyl derivatives and in particular N-acetyl derivatives, are also considered as peptides according to the invention.

The term "immunochemical reagent" signifies that the peptides according to the invention have been bound to a suitable support or have been provided with a labelling substance.

The supports which can be used are, for example, the inner wall of a microtest well or a cuvette, a tube or capillary, a membrane, filter, test strip or the surface of a particle such as, for example, a latex particle, an erythrocyte, a dye sol, a metal sol or metal compound as sol particle.

Labelling substances which can be used are, inter alia, a radioactive isotope, a fluorescent compound, an enzyme, a dye sol, metal sol or metal compound as sol particle.

In a method for the detection of antibodies directed against a centromere antigen in a test fluid, an immunochemical reagent according to the invention is brought into contact with the test fluid. After which, the presence of immune complexes formed between the peptide and antibodies in the test fluid is a measure for the presence of said antibodies in the test fluid.

The immunochemical reaction which takes place using these detection methods is preferably a sandwich reaction, an agglutination reaction, a competition reaction or an inhibition reaction.

For the detection of a centromere antigen, for instance CENP-B, in a test fluid an immunochemical reagent according to the invention is brought into contact with the test fluid and ACA after which the presence of immune complexes formed is detected and, from this, the presence of CENP-B antigen in a test fluid can be determined.

A particularly suitable method for the detection of CENP-B antigen in a test fluid which can be used is a competition reaction between a peptide according to the invention provided with a labelling substance and a CENP-B antigen (present in the test fluid) for a binding site on the antibody directed against CENP-B which is bound to a solid support.

A test kit according to the invention comprises an immunochemical reagent as described above. For carrying out a sandwich reaction, the test kit may comprise, for example, a peptide according to the invention bound to a solid support, for example the inner wall of a microtest well, and either a labelled synthetic peptide according to the invention or a labelled anti-antibody.

For carrying out a competition reaction, the test kit may comprise a peptide according to the invention bound to a solid support, a labelled antibody directed against CENP-B antigen preferably a monoclonal antibody directed against said peptide then being used to compete with ACA in a test fluid.

In an agglutination reaction an immunochemical reagent which comprises a peptide according to the invention bound to particles including sols must be brought directly into contact with the test fluid in which the antibodies directed against CENP-B antigen which are to be detected are present.

Another embodiment of a test kit is, for example, the use of a labelled peptide according to the invention as immunochemical reagent in a competition reaction with a CENP-B antigen to be detected for a binding site on the antibody directed against CENP-B, which is bound to a solid support.

#### Example I

##### Sera

Most patient sera were obtained from the Department of Rheumatology of the University Hospital St. Radboud at Nijmegen, The Netherlands. Some additional sera were received from hospitals in Enschede, Deventer and Groningen, The Netherlands.

##### Isolation of cDNA clones encoding CENP-B fragments

A mixture of two human sera, both containing anticentromere antibodies, was used to screen a human placental cDNA expression library (Clontech HL100 8b) constructed with the  $\lambda$ gt11 vector. Each serum was used at a dilution of 1:1000. To detect specifically bound antibody,  $^{125}$ I-labelled sheep anti-human immunoglobulin F(ab)<sub>2</sub> fragment (Amersham, U.K.) was used. By this method, four

immunopositive clones were detected. These clones, designated 23 (1009bp), 7(1210bp), 15- (1306bp) and 13(970bp) encode 60, 125, 157 and 161 amino acids residues from the carboxyl-terminal region of CENP-B, respectively.

The cDNA's were ligated into plasmids of the pGEX bacterial expression system and fused in phase to genetic sequences encoding glutathione S-transferase (GST; 26kDa). Clone 23 was inserted into the BamHI site of pGEX-2T and clone 15 was inserted into the EcoRI site of pGEX-3X. The fusion proteins produced are named GST-CENP-B/23 (33kDa) and GST-CENP-B/15 (52kDa).

*E. coli* DH5 $\alpha$  was used as host for maintaining the plasmids as well as for the production of fusion proteins.

#### DNA sequence analysis

cDNA fragments were digested with a variety of restriction enzymes. DNA fragments were ligated into the polylinker region of M13mp18. Sequence analysis of the DNA fragments was performed by the dideoxy chain termination method.

#### Gelelectrophoresis, protein blotting and detection of antigens

SDS-PAGE and transfer of proteins from 13% or 18% polyacrylamide gels onto nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell filters BA85, Dassel, Germany) was performed. The immunoblots were treated and processed. The antibody-antigen complexes were detected with either horseradish peroxidase-conjugated second antibodies or <sup>125</sup>I-labelled anti-human Ig (whole antibody) from sheep (Amersham).

#### Production and purification of fusion proteins

Overnight cultures of *E. coli* DH5 $\alpha$  transformed with pGEX-2T/23 or pGEX-3X/15 were diluted 1:20 in 100 ml of fresh L-broth containing 100  $\mu$ l/ml ampicillin and grown for 1 hour at 37 °C with intensive aeration before adding IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside: Research Organics, Cleveland, U.S.A.) to a final concentration of 0.1 mM. After a further 3 hours of growth, cells were pelleted and resuspended in 2 ml phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5 mM of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl chloride (PMSF).

Cells were lysed by three times freeze/thawing followed by an incubation with 50  $\mu$ g/ml deoxyribonuclease I (DNase I) (Sigma) for 20 min at 37 °C. Subsequently, 0.1 mg of lysozyme was added in 0.4 ml of 50% (w/v) sucrose, 10 mM Tris.HCl pH 8.0, 1 mM Na-EDTA pH 8.0 and 100 mM NaCl.

Incubation was performed for 30 min on ice. After adding 0.2 ml 10% (v/v) Nonidet P-40 and 0.2 ml Na-EDTA pH 7.5, the suspension was incubated on ice for another 15 min. After adding 3.5 mg/ml Zwittergent detergent 3-14 (Calbiochem, San Diego, U.S.A.), the suspension was sonicated three times 1 min on ice using a Branson sonifier B-12 with microtip. The suspension was layered on a 1 ml 40% (w/v) sucrose solution in PBS and centrifuged for 30 min at 10,000 g and +4 °C. The pellet was then resuspended in 0.5 ml 8M urea. This material was diluted 1:20,000 in coating buffer (Na-carbonate buffer pH 9.6: 35 mM NaHCO<sub>3</sub>/15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) for use in the ELISA.

#### Example II

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

For detection of antibodies against CENP-B an enzyme immunoassay was established using Zwittergent purified fusion protein GST-CENP-B/23. Optimal concentrations of antigen, patient sera and conjugates were established after appropriate chess board titrations.

Polystyrene microtiter plates (Greiner; 96 wells) were coated with 100  $\mu$ l/well of a dilution of GST-CENP-B/23 (0.5  $\mu$ g/ml) in coating buffer, and kept at +4 °C overnight. The antigen solution was then removed and the plates were washed 5 times with PBS/0.05% (v/v) Tween-20. The remaining free binding sites were blocked by adding 150  $\mu$ l/well of 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) diluted in coating buffer and incubating for 2 hours at room temperature. Thereafter, the plates were washed 5 times with PBS/Tween. The assay was performed with 50  $\mu$ l serum/well, diluted 1:100, 1:200, and 1:400 in RIA-buffer (0.3% (w/v) BSA, 350mM NaCl, 10mM Tris.HCl pH 7.6, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) Na-deoxycholate, 0.1% (w/v) Na-dodecyl sulfate), supplemented with 10% (v/v) normal rabbit serum. The plates were incubated at room temperature for 1 hour, and washed 6 times with PBS/Tween.

To each well 50  $\mu$ l of one of the following rabbit anti-human peroxidase-conjugated antibodies was added:

- IgG, IgA, IgM, kappa, lambda (DAKOpatts, Glostrup, Denmark: P-212), diluted 1:1000 in RIA-buffer.
- IgG ( $\gamma$ -chains) (DAKOpatts: P-214), diluted 1:5000 in RIA-buffer.
- IgA ( $\alpha$ -chains) (DAKOpatts: P-216), diluted 1:2000 in RIA-buffer.
- IgM ( $\mu$ -chains) (DAKOpatts: P-215), diluted 1:2000 in RIA-buffer.

The plates were incubated for 1 hour at room temperature and washed 6 times with PBS/Tween.

Bound antibodies were visualized with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) according to standard methods. The staining reaction was stopped after 10 min. by adding 100 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/well. Plates were read on a Bio-Rad model 2550 ELISA reader at 450nm. All sera were tested in quadruplicate and the results were averaged. Values higher than twice the level of pooled normal human serum (NS) were considered positive.

The 81 sera, positive for both anti-CENP-A and anti-CENP-B antibodies in the immunoblot analysis, all gave a positive immuno-reaction with the GST-CENP-B/23 protein. Very strong immuno-reactions (OD values >2) were obtained with 65 of the 81 sera. The OD values for the other 16 sera in this group ranged from 0.6 to 2.0.

In conclusion, the ELISA with CENP-B peptide according to the invention may be regarded as an advance in screening patient sera for the presence of ACA.

#### Claims

1. A peptide with amino acid sequence according to Figure 1 or fragment or analogue thereof which is immunochemically reactive with anticentromere autoantibodies or a polypeptide comprising said peptide, fragment or analogue thereof.
2. Immunochemical reagent comprising a peptide, fragment or analogue thereof or a polypeptide according to claim 1.
3. Method for the detection of anticentromere autoantibodies in a test fluid, characterized in that an immunochemical reagent according to claim 2 is brought into contact with the test fluid and the presence of immune complexes formed between the peptide and antibodies in the test fluid is detected, which is a measure for the presence of anticentromere autoantibodies in the test fluid.
4. Method for the detection of centromere antigen in a test fluid characterized in that an immunochemical reagent according to claim 2 is brought into contact with the test fluid and anticentromere autoantibodies, whereafter the presence of immune complexes formed is detected which is a measure for the presence of centromere antigen in the test fluid.
5. Method for the amplification and the detection of a centromere nucleic acid sequence in a test fluid using a sequence or fragment thereof coding for the amino acid sequence according to claim 1 as primer(s) in order to perform and

to detect a nucleic acid amplification of said centromere nucleic acid sequence.

6. Test kit for carrying out an immuno-assay according to claim 3 or 4.
7. Test amplification kit for carrying out an amplification method according to claim 5.

Figure 1

1 10  
P - V - P - S - F - G - E - A - M - A - Y - F - A - M - V - K -  
20 30  
R - Y - L - T - S - F - P - I - D - D - R - V - Q - S - H - I -  
40  
L - H - L - E - H - D - L - V - H - V - T - R - K - N - H - A -  
50 60  
R - Q - A - G - V - R - G - L - G - H - Q - S



European Patent  
Office

# EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 93 20 0062

Page 1

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
D,X	JOURNAL OF CELL BIOLOGY vol. 104, no. 4, April 1987, NEW YORK, USA pages 817 - 829 W. EARNSHAW ET AL. 'Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen.' * abstract; figure 9 * ---	1-7	C07K13/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68
X	CHROMOSOMA vol. 100, no. 6, July 1991, BERLIN, GERMANY pages 360 - 370 K. SULLIVAN ET AL. 'CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins.' * abstract; figures 2,5,7 * ---	1-7	
X	MOLECULAR BIOLOGY REPORTS vol. 15, no. 3-4, 1991, BOSTON MA, USA page 177 K. SKRINER ET AL. 'Antigenicity of the carboxy-terminus of CENP-B.' * abstract * ---	1-4,6	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
X	JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY vol. 97, no. 2, August 1991, BALTIMORE MD, USA pages 378 - 380 Y. MURO ET AL. 'Purification of a human centromere antigen (CENP-B) and application of DNA immunoprecipitation to quantitative assay for anti-CENP-B antibodies.' * the whole document * ---	1-4,6	C07K C12Q G01N
A	WO-A-9 106 572 (GENERAL HOSPITAL CORPORATION) * claims * ---	1-4,6	
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 08 APRIL 1993	Examiner NOOIJ F.J.M.
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons A : number of the same patent family, corresponding document			



European Patent  
Office

# EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 93 20 0062  
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. CL.5)
P,X	MOLECULAR BIOLOGY REPORTS vol. 16, no. 1, February 1992, BOSTON MA, US pages 49 - 59 R. VERHEIJEN ET AL. 'Molecular cloning of a major CENP-B epitope and its use for the detection of anticentromere autoantibodies.' * abstract; figure 1 *  -----	1-7	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. CL.5)
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 08 APRIL 1993	Examiner NOOIJ F.J.M.
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document  T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons  A : member of the same patent family, corresponding document			

EP 0 7 08 14 1 1993 01.12 (P0001)



# DOCUMENT INFO

Filename: WO91011511.pdf

File Path: 001Source\Foreign Patents

DOCUMENT INFO

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p><b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b>          C12N 9/00, 15/82, 15/54          C12N 5/04, 1/00, A01H 1/06</p>	<b>A1</b>	<p><b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b>    <b>WO 91/11511</b></p> <p><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b>                      8. August 1991 (08.08.91)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b>                      PCT/EP91/00145</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b>    25. Januar 1991 (25.01.91)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b>                    P 40 02 885.2                      1. Februar 1990 (01.02.90)                      DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> MÜLLNER, Hubert [DE/DE]; Staufstraße 1, D-6233 Kelkheim (DE). SCHNEIDER, Rudolf [DE/DE]; Feldbergstraße 98, D-6233 Kelkheim (DE). UHLMANN, Eugen [DE/DE]; Zum Talblick 31, D-6246 Glashütten (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p><b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, PL, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.            Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b>                      PCT/EP91/00145</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b>    25. Januar 1991 (25.01.91)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b>                    P 40 02 885.2                      1. Februar 1990 (01.02.90)                      DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> MÜLLNER, Hubert [DE/DE]; Staufstraße 1, D-6233 Kelkheim (DE). SCHNEIDER, Rudolf [DE/DE]; Feldbergstraße 98, D-6233 Kelkheim (DE). UHLMANN, Eugen [DE/DE]; Zum Talblick 31, D-6246 Glashütten (DE).</p>	<p><b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, PL, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.            Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b>                      PCT/EP91/00145</p> <p><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b>    25. Januar 1991 (25.01.91)</p> <p><b>(30) Prioritätsdaten:</b>                    P 40 02 885.2                      1. Februar 1990 (01.02.90)                      DE</p> <p><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> MÜLLNER, Hubert [DE/DE]; Staufstraße 1, D-6233 Kelkheim (DE). SCHNEIDER, Rudolf [DE/DE]; Feldbergstraße 98, D-6233 Kelkheim (DE). UHLMANN, Eugen [DE/DE]; Zum Talblick 31, D-6246 Glashütten (DE).</p>	<p><b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, PL, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.            Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p><b>(54) Title:</b> EXPRESSION OF A MULTIGENE RNA WITH SELF-SPLICING ACTIVITY</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> EXPRESSION EINER MULTIGEN RNA MIT SELF-SPLICING AKTIVITÄT</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>An RNA is expressed which is capable of liberating two or more active genes by means of in-built ribozyme structures. Expression can take place in plants or in other organisms.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Eine RNA wird exprimiert, die durch eingefügte Ribozymstrukturen zwei oder mehrere aktive Gene freisetzen kann. Die Expression kann in Pflanzen oder anderen Organismen erfolgen.</p>				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

## Beschreibung

Expression einer multigen RNA mit Self-splicing Aktivität

RNA-Moleküle können unter geeigneten Voraussetzungen ohne Beteiligung von Proteinen an anderen RNA-Molekülen Reaktionen katalysieren oder autokatalytisch Fragmente aus eigenen Molekülen abspalten. So wird vom 3'-Ende der 23s rRNA von *Tetrahymena thermophila* autokatalytisch ein Intron mit 413 Nukleotiden entfernt und in eine zirkuläre Form übergeführt. Dies geschieht durch eine Reihe von Phosphoestertransfer-Reaktionen mit Beteiligung von Guanosin-Kofaktoren (Cech, T.R., *Nature* 30, 578-583 (1983)). Je nach RNA Substrat oder den gewählten Reaktionsbedingungen kann das Intron als spezifische Ribonuclease, terminale Transferase, Phosphotransferase oder saure Phosphatase funktionieren. Dabei kann ein RNA-Molekül einige Umsetzungen vornehmen, ohne selbst verändert zu werden und verhält sich in dieser Hinsicht wie ein Enzym. Für RNA-Moleküle mit diesen Eigenschaften wurde deshalb der Begriff Ribozym geprägt.

Ähnliche Reaktionen ohne Beteiligung von Proteinen konnten auch für einige viroide RNAs und Satelliten-RNAs gezeigt werden. So scheint für Avocado Sunblotch Viroid (ASBV) (Hutchins, C.J. et al. *Nucleic Acids Res.* 14, 3627-3640 (1986)), Satelliten-RNA von Tobacco Ringspot Virus (sTobRV) (Prody, G.A. et al., *Science* 231, 1577-1580 (1986)) und Satelliten-RNA von Luzerne Transient Streak Virus (sLTSV) (Forster A.C. et al., *Cell* 49, 211-220 (1987)) eine Selbst-Prozessierung eine essentielle Reaktion für die Vermehrung zu sein. Während der Replikation dieser RNAs werden vermutlich zirkuläre Formen gebildet, die als "Templates" zur Synthese von RNAs mit Überlänge führen. Diese Transkripte werden durch die selbstkatalysierten, endonucleolytischen Reaktionen auf die richtige Genomlänge zurechtgeschnitten.

Die Strukturen der RNAs, die diese vermutlich für die Reaktion einnehmen, wurden als "hammerheads" beschrieben (Forster A.C. et al., Cell 49, 211-220 (1987)); Haseloff, J. et al., Nature 334, 585-591 (1988)).

5

Die Schnittstellen für diese RNA-Enzyme sind spezifisch und müssen bestimmte strukturelle Voraussetzungen aufweisen, damit eine Prozessierung erfolgen kann.

10 Es wurde nun überraschend gefunden, daß Wirtszellen beliebiger Organismen mit Vektoren, die DNA kodierend für Ribozym RNA verknüpft mit funktionellen Genen enthalten, transformiert werden können, so daß die genannte RNA exprimiert und anschließend gespleißt wird.

15

Die Erfindung betrifft somit:

1. Ein Hybridgen, bestehend aus einer Gensequenz, kodierend für Ribozym-RNA, und einem oder unterschiedlichen funktionellen Genen, in einer oder mehreren Kopien, wobei die Gensequenzen über einen Spacer, der auf der RNA-Ebene ein Substrat für das Ribozym darstellt, verknüpft ist.

20

25 2. Wirtszellen, die das unter 1. charakterisierte Gen enthalten.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche definiert.

30

Unter einem funktionellen Gen, versteht man einen DNA-Abschnitt im Genom, der für ein Polypeptid codiert. Das Polypeptid kann für sich ein funktionelles Protein darstellen oder als Untereinheit eines Enzymkomplexes fungieren.

35

Das erfindungsgemäße Gen ist so konstruiert, daß von einem Promotor aus mehrere Gene, beispielsweise ganze Synthesewege für die Herstellung von z.B. Aminosäuren, wie Glycin, Nukleotiden, Sekundär Metaboliten wie Antibiotika, Cofaktoren von Enzymen, Hormonen, wie das  
5 Schilddrüsenhormon, in Pflanzen oder Mikroorganismen exprimiert werden können. Es sollen damit einmal artfremde Stoffe in entsprechenden Pflanzen oder Mikroorganismen hergestellt werden bzw. soll die Ausbeute in Pflanzen oder  
10 Mikroorganismen, die diese Stoffe natürlich synthetisieren, erhöht werden. Gene kodierend für entsprechende Polypeptide können unter Verwendung von Kontrollsequenzen erfindungsgemäß Anwendung finden.

15 Ferner ist es möglich, ein Gen für ein bestimmtes funktionelles Protein in mehreren Kopien einzusetzen, z.B. um die Ausbeute eines Proteins wie Insulin oder Transaminase zu erhöhen.

20 Weiterhin ist die Expression eines oder mehrerer Selektionsmarker mit dem erfindungsgemäßen System möglich. Dazu können beispielsweise Gene für folgende Proteine Anwendung finden:  $\beta$ -Lactamase,  $\beta$ -Galaktosidase, Phosphinotricin-acetyl-transferase, Chloramphenicol-acetyl-  
25 transferase oder Thymidinkinase.

Bevorzugt wird mit dem Acetyltransferasegen für das Herbizid Phosphinotricin und dem Cat-Gen aus dem Transposon Tn9 für die Chloramphenicolacetyltransferase gearbeitet.

30 Das Acetyltransferasegen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Wohleben, W. et al., Gene 70, 25-37 (1988)), kann aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden zusammengesetzt werden, wobei es für die Expression in Pflanzen auch  
35 modifiziert werden kann. Das Gen vermittelt Resistenz gegen Phosphinotricin in transgenen Pflanzen, die das Produkt

konstitutiv exprimieren. Das Cat-Gen bewirkt Resistenz gegen Chloramphenicol. Ebenso wie das Acetyltransferasegen acetyliert das Cat-Gen sein Produkt. Das Cat-Gen stammt aus Tn9 (Alton, N.K. et al., Nature 15 282, 864-866, 1979), ist  
5 aber auch käuflich erhältlich.

Die Gene sind durch Ribozymsubstratsequenzen, sogenannte Spacer verknüpft und werden durch eine Ribozymstrukturdomäne desselben Moleküls freigesetzt. Auf  
10 diese Weise können mindestens 2 bis zu ca. 25 oder mehr Gensequenzen in einem Organismus exprimiert werden. Die Freisetzung kann auch über ein getrennt exprimiertes Ribozymmolekül erfolgen.

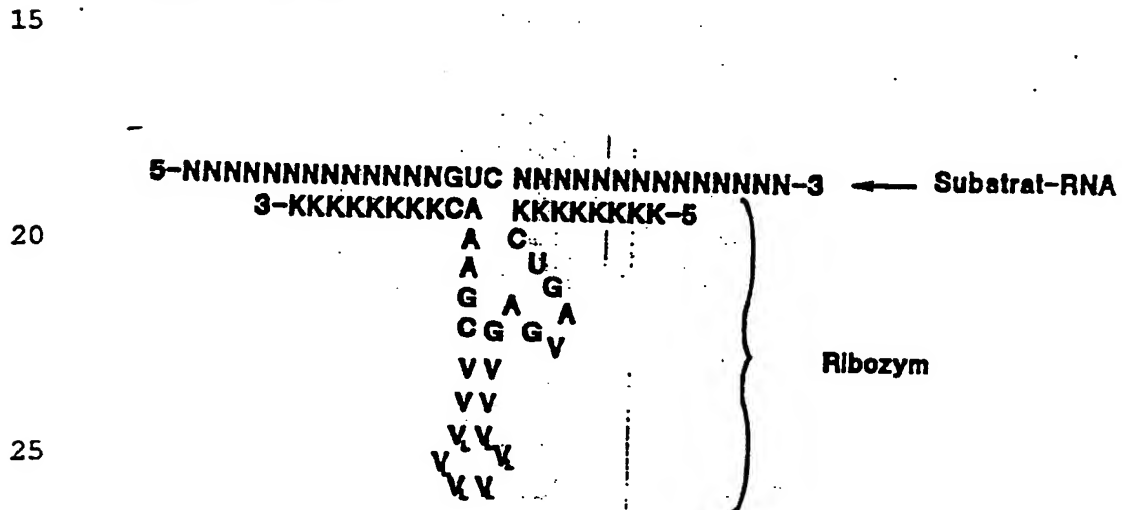
15 Die entsprechend transkribierte RNA ist im wesentlichen so zusammengesetzt, daß sich die Ribozyme bevorzugt am 3'- bzw. 5'-Ende des RNA Moleküls befinden. Als Spacer wird eine Sequenz von 40-50 Nukleotiden eingeschoben, die im ganzen oder in einem mindestens 10, bevorzugt 15-35  
20 Nukleotide zählenden Teilbereich zur Sequenz des Ribozyms komplementär ist. Die Ribozym-Sequenz der RNA kann sich so an den Spacer anlagern und diesen unmittelbar hinter einer definierten Sequenz schneiden. Als Ribozymschnittstelle wird bevorzugt ein GUC-Triplet verwendet. Die Anzahl der  
25 verknüpften Gene kann jeweils durch Einfügen von weiteren Spacern vermehrt werden, wobei deren Sequenz gleich oder verschieden vom ersten eingefügten Spacer sein kann. Falls sie verschieden ist, wird im gleichen RNA-Molekül eine weitere Ribozymstrukturdomäne passend zu dieser Sequenz  
30 geschaffen.

Die für diese RNA benötigten Spacer- und Ribozym-Sequenzen können synthetisch hergestellt werden. Die Verknüpfung mit den Genen erfolgt über geeignete ansynthetisierte Linker.  
35

Spacer und Ribozym werden analog zu Ribozymstrukturen der Natur synthetisiert (Uhlenbeck, O.C., Nature 328, 596-600,

1987). Dabei können diese Sequenzen natürlich vorkommende Ribozyme nachbilden (Forster A.C. et al., Cell 49, 211-220, (1987)) oder so gestaltet werden, daß die essentiellen Strukturen des Ribozyms vorhanden sind, für nicht  
 5 essentielle Teile aber andere Sequenzen gewählt werden. Bei der Grundkonstruktion kann im wesentlichen nach Haseloff, J. et al., Nature 334, 585-591, 1988 vorgegangen werden. In den Spacerteil der RNA wird eine GUC-Sequenz eingebaut, um die in 5'- und 3'-Richtung Sequenzen liegen,  
 10 die komplementär zu einer beschriebenen Ribozym-Sequenz sind.

Spacer und Ribozym auf der RNA-Ebene können im Schema wie folgt aussehen:



wobei

- 35 N Nukleotide der Substrat-RNA, A, C, G oder U  
 K komplementäre Nukleotide zu N im Ribozym  
 V variable Nukleotide A, C, G oder U im Ribozym und



$V_L$  variable Nukleotide A, C, G oder U im Loop des Ribozyms bedeutet.

Die Nukleotidanzahl von  $V_L$  kann 0-550 betragen.

5

Das erfindungsgemäße Gen wird in einen intermediären Vektor mit Pflanzen-Promotor kloniert. Derartige Vektoren sind beispielsweise die Plasmide pNCN (Fromm M. et al., PNAS 82, 5824-5826 (1985) oder pNOS (An G. et al. EMBO J. 4, 277-276 (1985) oder bevorzugt pDH51 (Pietrzak, M. et al. NAR 14, 5857-5861, (1986)).

Nach anschließender Transformation von E. coli, wie z.B. E. coli MC 1061, DH1, DK1, GM48 oder XL-1, werden positive Klone nach an sich bekannten Methoden (Maniatis et al., Lab. Manual), wie Plasmidminipräparation und Spaltung mit einem entsprechenden Restriktionsenzym, identifiziert. Diese positiven Klone werden dann in einen binären Pflanzenvektor subkloniert. Als Pflanzenvektoren können pGV3850 (Zambrysky, P. et al., EMBO J. 2, 2143-2150 (1983)) oder pOCA18 (Olszewski, N., NAR 16, 10765-10782, (1988)) eingesetzt werden. Vorteilhaft wird mit pOCA18 gearbeitet.

Die erhaltenen binären Pflanzenvektoren, die einen Pflanzenpromotor mit dem angehängten DNA-Fragment, das wie oben angegeben konstruiert ist, in der T-DNA enthalten, werden verwendet, um Pflanzen zu transformieren. Dies kann durch Techniken wie Elektroporation oder Mikroinjektion erfolgen.

30

Bevorzugt wird die Kokultivierung von Protoplasten oder die Transformation von Blattstückchen mit Agrobakterien angewandt. Dazu wird das Pflanzenvektorkonstrukt durch Transformation mit gereinigter DNA oder, vermittelt über einen Helferstamm wie E. coli SM10 (Simon R. et al., Biotechnology 1, 784-791 (1983)), in Agrobacterium tumefaciens wie A 282 mit einem Ti Plasmid über ein

35

"triparental mating" transferiert. Direkte Transformation und triparental mating wurden, wie in, "Plant Molecular Biology Manual" (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)) beschrieben, durchgeführt.

5  
Es können grundsätzlich alle Pflanzen mit den die  
erfindungsgemäße, konstruierte DNA tragenden binären  
Pflanzenvektoren transformiert werden. Bevorzugt sind  
dikotyledone Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen, die  
10 beispielsweise Stärke, Kohlenhydrate, Eiweiße oder Fette in  
nutzbaren Mengen in ihren Organen produzieren oder  
speichern oder die Obst und Gemüse produzieren oder die  
Gewürze, Fasern und technisch verwertbare Produkte oder  
Arzneimittel, Farbstoffe oder Wachse liefern ebenso wie  
15 Futterpflanzen. Als Beispiel sollen Tomate, Erdbeere,  
Avocado, sowie Pflanzen, die tropische Früchte tragen, z.B.  
Papaya, Mango, aber auch Birne, Apfel, Nektarine, Aprikose  
oder Pfirsich genannt werden. Ferner sollen als zu  
transformierende Pflanzen beispielhaft alle Getreidearten,  
20 Raps, Kartoffeln, Sojabohne, Baumwolle, Mais, Zuckerrübe  
oder Sonnenblume, aufgeführt werden.

Die transformierten Zellen werden mit Hilfe eines  
Selektionsmediums selektiert, zu einem Kallus  
25 herangezüchtet und auf einem entsprechenden Medium zur  
Pflanze regeneriert (Shain et al., Theor. appl. Genet. 72,  
770-770 (1986); Masson, J. et al., Plant Science 53,  
167-176 (1987), Zhan et al., Plant Mol. Biol. 11, 551-559  
(1988); McGranham et al., Bio/Technology 6, 800-804 (1988)  
30 Novrate et al., Bio/Technology 7, 154-159 (1989).

Die resultierende Pflanze wird durch die Transformation  
insofern verändert, als in den Zellen die mit Hilfe der  
konstruierten Oligonukleotide exprimierte RNA durch die  
35 Ribozymaktivität an GUC-Schnittstellen aufgespalten wird,  
um die Gene freizusetzen.

Eine Anwendung des beschriebenen Systems ist auch in Bakterien, Zellkulturen, Hefen oder anderen eukaryontischen Organismen möglich.

- 5 In den folgenden Beispielen wird die Erfindung weitergehend erläutert.

### Beispiele

- 10 1) Verwendete DNA Strukturen  
a) Acetyltransferasegen mit SalI-Linkern

		9		18		27		36		45					
5'	GTC	GAC	ATG	TCT	CCG	GAG	AGG	AGA	CCA	GTT	GAG	ATT	AGG	CCA	GCT
3'		6	TAC	AGA	GGC	CTC	TCC	TCT	GGT	CAA	CTC	TAA	TCC	GGT	CGA
15		54		63		72		81		90					
	ACA	GCA	GCT	GAT	ATG	GCC	GCG	GTT	TGT	GAT	ATC	GTT	AAC	CAT	TAC
	TGT	CGT	CGA	CTA	TAC	CGG	CGC	CAA	ACA	CTA	TAG	CAA	TTG	GTA	ATG
		99		108		117		126		135					
	ATT	GAG	ACG	TCT	ACA	GTG	AAC	TTT	AGG	ACA	GAG	CCA	CAA	ACA	CCA
	TAA	CTC	TGC	AGA	TGT	CAC	TTG	AAA	TCC	TGT	CTC	GGT	GTT	TGT	GGT
		144		153		162		171		180					
20	CAA	GAG	TGG	ATT	GAT	GAT	CTA	GAG	AGG	TTG	CAA	GAT	AGA	TAC	CCT
	GTT	CTC	ACC	TAA	CTA	CTA	GAT	CTC	TCC	AAC	GTT	CTA	TCT	ATG	GGA
		189		198		207		216		225					
	TGG	TTG	GTT	GCT	GAG	GTT	GAG	GGT	GTT	GTG	GCT	GGT	ATT	GCT	TAC
	ACC	AAC	CAA	CGA	CTC	CAA	CTC	CCA	CAA	CAC	CGA	CCA	TAA	CGA	ATG
		234		243		252		261		270					
	GCT	GGG	CCC	TGG	AAG	GCT	AGG	AAC	GCT	TAC	GAT	TGG	ACA	GTT	GAG
	CGA	CCC	GGG	ACC	TTC	CGA	TCC	TTG	CGA	ATG	CTA	ACC	TGT	CAA	CTC
25		279		288		297		306		315					
	AGT	ACT	GTT	TAC	GTG	TCA	CAT	AGG	CAT	CAA	AGG	TTG	GGC	CTA	GGA
	TCA	TGA	CAA	ATG	CAC	AGT	GTA	TCC	GTA	GTT	TCC	AAC	CCG	GAT	CCT
		324		333		342		351		360					
	TCC	ACA	TTG	TAC	ACA	CAT	TTG	CTT	AAG	TCT	ATG	GAG	GCG	CAA	GGT
	AGG	TGT	AAC	ATG	TGT	GTA	AAC	GAA	TTC	AGA	TAC	CTC	CGC	GTT	CCA
		369		378		387		396		405					
30	TTT	AAG	TCT	GTG	GTT	GCT	GTT	ATA	GGC	CTT	CCA	AAC	GAT	CCA	TCT
	AAA	TTC	AGA	CAC	CAA	CGA	CAA	TAT	CCG	GAA	GGT	TTG	CTA	GGT	AGA
		414		423		432		441		450					
	GTT	AGG	TTG	CAT	GAG	GCT	TTG	GGA	TAC	ACA	GCC	CGG	GGT	ACA	TTG
	CAA	TCC	AAC	GTA	CTC	CGA	AAC	CCT	ATG	TGT	CGG	GCC	CCA	TGT	AAC
		459		468		477		486		495					
	CGC	GCA	GCT	GGA	TAC	AAG	CAT	GGT	GGA	TGG	CAT	GAT	GTT	GGT	TTT
	GCG	CGT	CGA	CCT	ATG	TTC	GTA	CCA	CCT	ACC	GTA	CTA	CAA	CCA	AAA
35		504		513		522		531		540					
	TGG	CAA	AGG	GAT	TTT	GAG	TTG	CCA	GCT	CCT	CCA	AGG	CCA	GTT	AGG
	ACC	GTT	TCC	CTA	AAA	CTC	AAC	GGT	CGA	GGT	TCC	GGT	CAA	TCC	
		549		558											
	CCA	GTT	ACC	CAG	ATC	TGA	G		3'						
	GGT	CAA	TGG	GTG	TAG	ACT	CAG	CTG	5'						

## b) Spacer mit SalI und HindIII-Linkern

5' TCG ACT TAC GGC TAA AAT GGT CAG TAT CCC CCA AAG GCG GCC GC 3'  
 3' GA ATG CCG ATT TTA CCA GTC ATA GGG GGT TTC CCG CCG CGT  
 CGA 5'

c) Cat-Gen aus Tn9 nach Alton et al. Nature 282, 864-866 (1979)

## d) Ribozymstrukturdomäne mit HindIII- und PstI-Linkern

5' AGC TGC GGC CGC TTA CGG CTA AAA TGG TCA GTA TCC CCC AAA GGG  
 3' CG CCG GCG AAT GCC GAT TTT ACC AGT CAT AGG GGG TTT CCC  
 GTA CCC CTT TCG GGC ATA CTC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACC  
 CAT GGG GAA AGC CCG TAT GAG ACT ACT CAG GCA CTC CTG CTT TGG  
 ATT TTA GCC GTA ACT GCA 3'  
 TAA AAT CCG CAT TG 5'

Die Oligonukleotide unter a), b) und d) wurden nach der Phosphoramidit Methode mit einem DNA-Synthesizer synthetisiert.

## 2) Klonierung der Fragmente

Die unter 1a)-d) bezeichnete DNA wurde in gleichen molaren Mengen ligiert und in die SalI/PstI Stellen des Vektors pDH51 eingebaut. Positive Klone wurden durch Hybridisierung mit allen 4 verwendeten radioaktiv markierten DNA-Abschnitten identifiziert.

### 3) Klonierung in pOCA18

Das Plasmid pOCA18 wird in Olszewski, N. et al. NAR 16, 10765-10782 (1988) nacharbeitbar beschrieben.

5

Ein 2,4 kbp langes *NosI*/*HindIII* Fragment wurde aus dem beschriebenen Vektor pDH51 mit der inserierten Konstruktion isoliert und nach Auffüllen der Enden in einen *Bam HI* geschnittenen und aufgefüllten pOCA18 Vektor kloniert.

10

Positive Klone wurden durch Hybridisierung mit <sup>32</sup>P markierter DNA nachgewiesen.

### 4) Transformation von Agrobakterien

15 Der pOCA18 Vektor mit dem beschriebenen 35S Promotor/Insert wurde in den Agrobakterienstamm A 282 (Pharmacia Freiburg, BR Deutschland, oder ATCC 37349, USA) überführt. Dies geschah durch ein Triparental Mating mit Hilfe des E. coli Stammes SM10 (Simon, R. et al. Bio/Technology 1, 784-791, 20 1983). Dazu gab man gleiche Mengen der Bakterien gemeinsam über Nacht auf einen Filter, spülte mit 2 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> ab und gab Aliquots davon auf YEB-Platten mit Tetrazyklin und Rifampicin (YEB: 1 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 0,5 % NaCl). Positive Agrobakterien konnten durch Hybridisierung 25 nachgewiesen werden.

### 5) Transformation von Tabak

Die Agrobakterien wurden in YEB Medium (1 % Hefeextrakt, 30 1 % Pepton, 0,5 % NaCl) mit Tetrazyklin und Rifampicin angezüchtet. 20 ml der Bakterien wurden abzentrifugiert, einmal in YEB Medium gewaschen und in 20 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> suspendiert in eine Petrischale gegeben. Als Pflanzenmaterial wurde *Nicotiana tabacum* Wisconsin 38 35 verwendet. Die Pflanzen waren 4 Wochen unter sterilen Bedingungen auf 2MS Medium Murashige T. et al., Physiol. Plant 15, 473-497 (1962) bei 25°C mit 16 Std. Licht pro Tag

kultiviert worden. Von diesen Pflanzen wurde ein 1 cm<sup>2</sup> Blattstückchen abgeschnitten, mit sterilem Schmirgelpapier verwundet und 30 sec in die Bakterienkultur eingetaucht. Die Blattstückchen wurden 2 Tage bei 25°C auf MS Medium, wie oben für 2MS beschrieben, gehalten und anschließend mit flüssigem 2MS Medium gewaschen. Danach kamen die Blattstückchen auf MSC 10 Platten (wie MS mit 1,5 % Agar) mit 100 µg/ml Kanamycin. Nach 5-6 Wochen konnten regenerierte Pflanzen in größere Gefäße umgepflanzt werden, wo sie nach 2-3 Wochen Wurzeln bildeten.

#### 6) Nachweis der Transformation

Aus etwa 8 Wochen alten transformierten Tabakpflanzen wurde mit Standardmethoden (Maniatis et al., Lab. Journal) DNA isoliert, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit <sup>32</sup>P markierter Insert-DNA hybridisiert.

In der DNA der Pflanze konnten ein Einbau der gewünschten Sequenzen nachgewiesen werden.

#### 7) Nachweis der Expression der RNA

Aus den eben erwähnten Tabakpflanzen wurde aus einer zweiten Blattprobe RNA isoliert, aus einem Formaldehydgel auf Nitrozellulose transferiert und wie oben hybridisiert. Es konnten verschiedene Banden nachgewiesen werden, die die erwarteten Größen zeigten.

#### 8) Nachweis der in vitro Funktion der Ribozym RNA

Aus den pBluescript SK+ Klonen mit dem insertierten Gesamt-Oligo wurde mit T3 bzw. T7 Polymerase in einem Reaktionsansatz (Stratagene, Product Information zu SK+) die multifunktionelle RNA produziert und anschließend isoliert. Hybridisierung dieser RNA mit einzelnen Komponenten zeigte eine Aufspaltung der RNA.

### 9) Nachweis der in vivo Aktivität der Gene

Transformierte Pflanzen zeigten Wachstum auf 2MS Medium mit Phosphinotricin. Im Sprühversuch erwiesen sich die Pflanzen  
5 gleichfalls als resistent. Ein Versuch zur Acetylierung von Chloramphenicol zeigte, daß die Pflanzen ein aktives Enzym exprimieren.

**Patentansprüche:**

1. Hybridgen, bestehend aus einer Gensequenz, kodierend für Ribozym-RNA, und einem oder unterschiedlichen funktionellen Gen, in einer oder mehreren Kopien, wobei die Gensequenzen jeweils über einen Spacer, der auf der RNA-Ebene ein Substrat für das Ribozym darstellt, verknüpft ist.
2. Hybridgen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das funktionelle Gen für die Phosphinothricin-Acetyltransferase und/oder für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert.
3. Wirtszelle, enthaltend ein Gen nach Anspruch 1 oder 2.
4. Mikroorganismus oder Pflanzen, Pflanzenzellen, sowie Teile oder Samen der Pflanzen, enthaltend ein Gen nach Anspruch 1 oder 2.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/00145

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>1</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. <sup>5</sup> C 12 N 9/00, 15/82, 15/54, 5/04, 1/00, A 01 J 1/06																	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched <sup>2</sup></div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl. <sup>5</sup></td> <td style="padding: 5px;">C 12 N</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>1</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. <sup>5</sup>	C 12 N											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl. <sup>5</sup>	C 12 N																
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>1</sup></b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Category <sup>1</sup></th> <th style="width: 70%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">Scientific American, volume 255, No 5 November 1986, (New York, US) T.R. Cech: "RNA as an enzyme", pages 76-84 see the whole article</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21 June 1989 see examples; claims; page 4, lines 21-27, 57-58</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">Nature, volume 334, 18 August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", pages 585-591 see the whole article</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">P, X</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0421376 (HOECHST AG) 10 April 1991 see the whole document</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-4</td> </tr> </table>			Category <sup>1</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	Y	Scientific American, volume 255, No 5 November 1986, (New York, US) T.R. Cech: "RNA as an enzyme", pages 76-84 see the whole article	1-4	Y	EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21 June 1989 see examples; claims; page 4, lines 21-27, 57-58	1-4	Y	Nature, volume 334, 18 August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", pages 585-591 see the whole article	1-4	P, X	EP, A, 0421376 (HOECHST AG) 10 April 1991 see the whole document	1-4
Category <sup>1</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>															
Y	Scientific American, volume 255, No 5 November 1986, (New York, US) T.R. Cech: "RNA as an enzyme", pages 76-84 see the whole article	1-4															
Y	EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21 June 1989 see examples; claims; page 4, lines 21-27, 57-58	1-4															
Y	Nature, volume 334, 18 August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", pages 585-591 see the whole article	1-4															
P, X	EP, A, 0421376 (HOECHST AG) 10 April 1991 see the whole document	1-4															
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>1</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">6 May 1991 (06.05.91)</td> <td style="padding: 5px;">21 June 1991 (21.06.91)</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">European Patent Office</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	6 May 1991 (06.05.91)	21 June 1991 (21.06.91)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	European Patent Office								
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report																
6 May 1991 (06.05.91)	21 June 1991 (21.06.91)																
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer																
European Patent Office																	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9100145

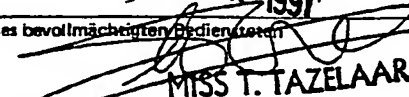
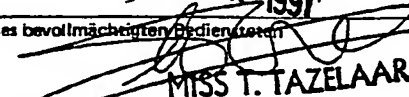
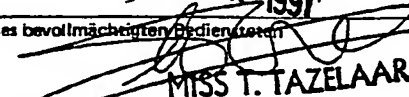
SA 44102

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 18/06/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0321201	21-06-89	AU-A- 2800789	19-07-89
		WO-A- 8905852	29-06-89
EP-A- 0421376	10-04-91	DE-A- 3933384	18-04-91

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00145

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. <sup>5</sup> C 12 N 9/00, 15/82, 15/54, 5/04, 1/00, A 01 H 1/06														
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="text-align: center; border: 1px solid black; padding: 2px;">Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup></div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.<sup>5</sup></td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C 12 N</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup></p>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl. <sup>5</sup>	C 12 N								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
Int.Cl. <sup>5</sup>	C 12 N													
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.<sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Scientific American, Band 255, Nr. 5, November 1986, (New York, US), T.R. Cech: "RNA as an enzyme", Seiten 76-84 siehe den ganzen Artikel --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21. Juni 1989 siehe Beispiele; Ansprüche; Seite 4, Zeilen 21-27, 57-58 --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Nature, Band 334, 18. August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", Seiten 585-591 siehe den ganzen Artikel --  ./.</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; padding: 5px;">1-4</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>	Y	Scientific American, Band 255, Nr. 5, November 1986, (New York, US), T.R. Cech: "RNA as an enzyme", Seiten 76-84 siehe den ganzen Artikel --	1-4	Y	EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21. Juni 1989 siehe Beispiele; Ansprüche; Seite 4, Zeilen 21-27, 57-58 --	1-4	Y	Nature, Band 334, 18. August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", Seiten 585-591 siehe den ganzen Artikel --  ./.	1-4
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>												
Y	Scientific American, Band 255, Nr. 5, November 1986, (New York, US), T.R. Cech: "RNA as an enzyme", Seiten 76-84 siehe den ganzen Artikel --	1-4												
Y	EP, A, 0321201 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION, AUSTRALIA) 21. Juni 1989 siehe Beispiele; Ansprüche; Seite 4, Zeilen 21-27, 57-58 --	1-4												
Y	Nature, Band 334, 18. August 1988, J. Haseloff et al.: "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities", Seiten 585-591 siehe den ganzen Artikel --  ./.	1-4												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>														
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">           Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <div style="text-align: center;">6. Mai 1991</div> </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">           Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: center;">21 JUN 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">           Internationale Recherchenbehörde  <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">           Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  <div style="text-align: center;">               MISS T. TAZELAAR           </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">6. Mai 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">21 JUN 1991</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;">               MISS T. TAZELAAR           </div>								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">6. Mai 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">21 JUN 1991</div>													
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;">               MISS T. TAZELAAR           </div>													

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	EP, A, 0421376 (HOECHST AG) 10. April 1991 siehe das ganze Dokument  -----	1-4

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9100145

SA 44102

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 18/06/91

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0321201	21-06-89	AU-A- 2800789	19-07-89
		WO-A- 8905852	29-06-89
EP-A- 0421376	10-04-91	DE-A- 3933384	18-04-91

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82